

PAT-NO: JP407265097A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 07265097 A
TITLE: DETERMINATION OF IRON
PUBN-DATE: October 17, 1995

INVENTOR-INFORMATION:

NAME
UMEMOTO, MASAO

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME
UMEMOTO MASAO

COUNTRY
N/A

APPL-NO: JP06096864
APPL-DATE: March 30, 1994

INT-CL (IPC): C12Q001/26

ABSTRACT:

PURPOSE: To enable high-sensitivity determination of iron under mild conditions simply in a shortened time by generating hydrogen peroxide through an enzyme reaction, oxidizing divalent iron into trivalent iron with the hydrogen peroxide in the presence of a reducing agent and determining the corresponding change in the hydrogen peroxide.

CONSTITUTION: An aqueous chelate such as EDTA or the like is added to a sample from living body to release iron from iron-binding proteins such as transferrin, albumen or globulin. Then, 4-aminoantipyrine, ascorbic acid as a reducing agent and glucose oxidase are added, then glucose and peroxidase are admixed thereto to liberate hydrogen peroxide so that the divalent iron is

oxidized into the trivalent iron by the hydrogen peroxide in the presence of a reducing agent. Then, the change in hydrogen peroxide corresponding to the iron oxidation is determined with the peroxidase-4-aminoantipyrin system whereby high-sensitive determination of iron in a sample can be done.

COPYRIGHT: (C)1995, JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-265097

(43) 公開日 平成7年(1995)10月17日

(51) Int.Cl.⁴

C 1 2 Q 1/26

識別記号

庁内整理番号

6807-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数5 書面 (全 6 頁)

(21) 出願番号

特願平6-96864

(22) 出願日

平成6年(1994)3月30日

(71) 出願人 593218716

梅本 雅夫

埼玉県北葛飾郡杉戸町清地五丁目20番16号

(72) 発明者

梅本 雅夫

埼玉県北葛飾郡杉戸町清地五丁目20番16号

(54) 【発明の名称】 鉄の定量方法

(57) 【要約】

【目的】 高感度な鉄の定量法を提供する

【構成】 水性媒体中、2価鉄イオンを含む試料と、還元剤共存下、オキシダーゼ反応により生成させた過酸化水素とを接触反応させ、対応する過酸化水素変化量をオキシダーゼ検出反応等、高感度な過酸化水素検出法により定量することを特徴とする鉄の測定方法。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 還元剤の共存下で2価鉄から3価鉄への酸化を行わせそれに対応する変化量を定量する鉄の分析法

【請求項2】 過酸化水素を発生させ、還元剤の共存下、過酸化水素による2価鉄から3価鉄への酸化を行わせ、対応する過酸化水素量の変化量を定量する請求項1に記載する鉄の分析法

【請求項3】 過酸化水素発生法がオキシダーゼ酵素反応であり、過酸化水素定量方法がオキシダーゼ検出反応である請求項2に記載する鉄の分析法

【請求項4】 鉄キレート剤を共存させる請求項2及び請求項3に記載する鉄の分析法

【請求項5】 トランスフェリン、アルブミン、グロブリン等の鉄結合タンパクから、鉄を水性キレート剤を用いて遊離させオキシドレゼクターゼ酵素反応を行う鉄の定量方法

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、酵素反応により発生させた過酸化水素が還元剤共存下2価鉄イオンにより増幅して消費されることを利用した極めて高感度な鉄の定量方法に関する。

【0002】

【従来の技術】微量鉄イオンの分析法としては、ビビリジン、0-フェナントロリン、バゾフェナントロリン、トリビリジルトリアミン、チオグリコール酸、チロンなどを用いる比色法がある。しかし、これらの方法は有機溶媒抽出を利用したり、反応、発色の条件が温和ではないため、酵素反応のような、簡便かつ迅速な測定には不適である。酵素反応を用いる鉄イオンの測定法としては、アコニターゼが鉄イオンにより活性化されることを利用した方法が報告されている（第32回日本臨床化学会年会要旨集p56b）。

【0003】2価鉄イオンが過酸化水素を還元することは周知のことであり、このことを利用して2価鉄イオンを求めることができる。電気化学的に鉄を測定する方法があり、鉄のターロメトリーとして古くから知られている。しかし、これらの方法では感度は悪く微量の鉄の分析には適さない。これらの方法以外により、鉄を高感度に検出する方法の発明が求められている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】最終液中濃度としてppt (ng/ml) という微量の鉄イオンを検出するには、2価鉄イオンによる過酸化水素還元作用の増幅と対応する微量の過酸化水素の変化量を高感度に検出する方法が用いられなければならない。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、水性媒体中、酵素反応又は電気化学的方法により過酸化水素を発生さ

2

せ、還元剤の共存下発生させた過酸化水素と2価鉄とを反応させ、過酸化水素の変化量を過酸化水素発色反応又は電気化学的方法により検出することを特徴とするものである。本発明が対象とする鉄濃度は極めて微量であるため、単に2価鉄により消費される過酸化水素量はわずかであるため、電気化学的及び吸光光度法等では検出できず、微量鉄の測定方法としては無効である。本発明は、2価鉄に微量の還元剤を共存させれば、協同作用的に過酸化水素が消費され、高感度に鉄を定量できることを見いだしたことにともづく。

【0006】ここに、水性媒体とは緩衝液、生理食塩水等の水を含有する液を表し、緩衝液としてはトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩緩衝液、リン酸緩衝液、グッド緩衝液、バルビタール緩衝液等が代表的である。鉄の還元剤としては $Fe^{2+} + Fe^{3+}$ 系の酸化還元電位の見掛け電位より低いものを用いる。アスコルビン酸、塩酸ヒドロキシルアミン、チオ硫酸ナトリウム、チオグリコール酸、ヒドロキノン、硫酸ヒドラジンなどがある。特にヒドロキシルアミンとその塩、ヒドラジンとその塩は、ペルオキシダーゼ反応を阻害せず、かつ、過酸化水素の消費反応が遅いので、優れた還元剤である。又、アスコルビン酸はアスコルビン酸オキシダーゼにより消費できるため、過酸化水素生成-発色反応の前に大部分を消費することができる。なお、ヒドロキシルアミンもヒドロキシルアミン脱水素酵素により消去できる。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元体（NADH）とフェリシアンイオンからジアフォラーゼ反応により生成したフェロシアンイオンを還元体として用いることもできる。この場合は、フェロシアンイオンの過酸化水素消費速度は遅い。

【0007】過酸化水素生成反応としては、電気化学的な方法もあるが基質と酵素により過酸化水素を生成するオキシダーゼ酵素反応が最も適している。この場合、直接過酸化水素を生成しないが、最終的にオキシダーゼ酵素反応に結びつけられるすべての酵素反応が含まれる。オキシダーゼ酵素反応のうち、生体試料等に含まれる物質を基質とし、よく用いられる方法としては、グルコースオキシダーゼ法、コレステロールオキシダーゼ法、ガラクトースオキシダーゼ法、グリセロールオキシダーゼ法、尿酸オキシダーゼ（ウリカーゼ）法などがある。一般には用いられないがアミノ酸オキシダーゼ法、アミノオキシダーゼ法、アルデヒドオキシダーゼ法、グルタミンオキシダーゼ法、グリコールオキシダーゼ法、ジヒドロオロト酸オキシダーゼ法、ビルビン酸オキシダーゼ法、ヘキソースオキシダーゼ法、モノアミノオキシダーゼ法、ラトステロールオキシダーゼ法、リジンオキシダーゼ法、シュウ酸オキシダーゼ法、ヒドロキシ酸オキシダーゼ法などがある。

【0008】生体試料中には存在しないか、微量であつて、かつ基質、酵素共に長期安定であるものとしては、

50

コリンオキシダーゼ法、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ法、キサンチンオキシダーゼ法がある。

【0009】基質があらかじめ試料中に存在する場合については、基質をあらかじめ他の酵素反応により消去し別のものに変化させてから、上述の過酸化水素生成反応を行うか、基質を多量に存在させ、試料に含まれる基質の増加による影響をなくするか等の方法がある。これらの方法は、酵素的分析法では確立されており、よく利用されている。上述した過酸化水素生成を行う酵素反応は Cu^{2+} によって阻害されるものがあるが、うまい具合に微量の Fe^{2+} によっては阻害されない。

【0010】生成した過酸化水素を高感度に検出するには、電気化学的な方法【鈴木周一編、イオン電極と酵素電極、p86~106、講談社サイエンティフィック】の他にオキシダーゼ検出反応（カタラーゼ共役系、ペルオキシダーゼ共役系）、化学発光法等がある。カタラーゼ共役系は Hantzsch 反応を利用する方法、4-アミノ-3-ヒドラジノ-5-メルカプト-1, 2, 4-トリアゾール又は3-メチル-2-ベンゾチアゾリンヒドラジンをを用いる方法がある。ペルオキシダーゼ共役系は、多くの高感度発色試薬が開発されており、それらは["臨床化学実践マニュアル", 検査と技術増刊号, 1993年, 21巻, p23, 医学書院]に一覧表として記載されている。それらの発色試薬のモル吸光係数は $1 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ であり、最小のモル吸光係数を有する4-アミノアンチピリン（モル吸光係数 1×10^4 ）試薬であっても5ppb（ 10 ng/ml ）の鉄を十分な感度で測定できる。大きなモル吸光係数を有するN-スルフォプロピルアミンでは、ppt（ pg/ml ）の鉄が十分測定可能である。このような大きなモル吸光係数を有する発色試薬と還元剤共存下で Fe^{2+} による過酸化水素消費反応を組み合わせることにより、微量の鉄を定量することが可能である。以上のようなトリンダー発色試薬の他に、酸化還元発色試薬も用いることができるが、 Fe^{3+} を Fe^{2+} に還元する還元剤の影響をうけるので、鉄還元剤をあらかじめ消去した後で用いることができる。この試薬については同仁化学研究所カタログDOJIN17, p10に記載されている。感度的に劣るが、よう素イオン又はフェリシアンイオンと過酸化水素との反応を用いることもできる。以上のような分光学的方法の他に、過酸化水素電極法、ペルオキシダーゼ固定化酵素電極法が高感度検出法として用いることができる。

【0011】過酸化水素が Fe^{2+} により消費されその変化量を精度良く検出するには、過酸化水素量が検出反応にとって適切な量でなければならない。本発明では過酸化水素をオキシダーゼ酵素反応により発生させる方法を採用している。これによれば、過酸化水素の生成量を、補酵素、基質量等を制御することによりいかようにでも調節可能であること、過酸化水素生成速度も酵素量、補

酵素量、活性化剤の量等を制御することにより調節可能であるという優れた利点を有している。

【0012】次に、生体試料のように鉄が蛋白（トランスフェリン、アルブミン等）と結合している場合、キレート剤を用いて鉄を蛋白から遊離する。このような試料に対し本発明ではキレート剤を用いる方法を重要な構成要件としている。というのは、鉄を分子構成要素（補欠因子）とする酵素を用いる鉄の定量方法では、そのようなキレート剤を加えると失活し反応が進行しなくなる

10 が、本発明で用いるオキシダーゼ検出反応では鉄を補酵素としていないので失活しないため、キレート剤を共存させることができる。キレート剤を共存させることにより、従来、鉄を蛋白から遊離するために必要な操作であるpHを酸性にしたり、除蛋白するという過程が不要となり、測定操作の大幅な簡略化、測定系の自由な組み合わせが可能となる。さらに、重要な点は、本発明のオキシダーゼ検出反応といったオキシドレダクターゼ反応が、2価鉄キレートを共存させても遊離の2価鉄イオンと同様に進行することを見いだした点にある。この現象を利用すれば、オキシダーゼ反応以外のオキシレダクターゼ反応によって血清中の鉄の定量が可能となる。そのような酵素反応としてはフェロオキシダーゼI、フェロ

オキシダーゼII、リボアミドレダクターゼがある。又、2価鉄イオンが阻害するオキシドレダクターゼも同様にキレート剤共存下、阻害法によって鉄の定量が可能であり、これにはコリンデヒドロゲナーゼなどがある。

【0013】鉄キレート剤としては、エチレンジアミン四酢酸、トランス-1, 2-シクロヘキサジアン-N, N, N', N'-四酢酸、ジエチレンジアミン五酢酸、グリコールエーテルジアミン四酢酸、トリエチレンテトラミン六酢酸、ジアミノプロパノール四酢酸、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸、ジアミノプロパン四酢酸等が安定度定数が大きく好ましい。ニトロ三酢酸、ジヒドロキシエチルグリシン、イミノ三酢酸、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸、エチレンジアミン二プロピオン酸などは安定度はやや小さいが用いることができる。このようなキレート試薬のみならず、水溶性の鉄結合試薬、例えばバゾフェナントリンスルホン酸ナトリウム、フェロンなども用いることができる。

40 【0014】以下に本発明の実施態様の骨子を説明する。本発明の実施態様は過酸化水素生成過程と検出過程の2過程より構成される。試料としては、上水、廃水、生体試料（血液、血清、血しょう、尿、ヘモグロビンなど）、食品など広範囲を対象とすることができる。まず水性媒体に還元剤0.01~1mg/mlを加え、次に鉄を含む試料を加え、0~5分間8~50℃でインキュベートし（アスコルビン酸、塩酸ヒドロキシルアミンの場合は瞬時に還元されるので、インキュベートは不要である）3価鉄を2価鉄に還元する。2価鉄のみの場合は還元剤は後に加えてもよい。オキシダーゼ反応により過

5

酸化水素を生成する方法を用いる場合は、オキシダーゼかその基質をこのときの水性媒体に共存させてもよい。例えば、塩化コリン等を0.1~10mg/ml加えておく。又、発色反応の基質を加えておいてもよい。例えば、4-アミノアンチピリン等を0.05~1mg/mlを加えておく。次に残りの基質、オキシダーゼ反応の酵素及び発色反応の酵素を含む水性媒体を上記の液に加え、生じる吸光度変化量を求め、鉄の量を求める。オキシダーゼ酵素としては0.2~20U/ml、発色反応としてペルオキシダーゼを0.1~20U/mlを用いる。この酵素量は還元剤の種類に依存し、塩酸ヒドロキシルアミン、硫酸ヒドラジンなどの場合は少量でよい。残りの基質としては、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン0.1~2mg/mlを加える。この過酸化水素生成、発色反応は酵素反応として適切な条件であるpH6~7.5、温度8~50℃で行う。

【0015】水性媒体のpHとしては、2価鉄が酸素により3価鉄に酸化されるのを防ぐため、3価鉄から2価鉄への還元は酸性とするのがよい。この場合、弱い緩衝作用の水性媒体とし(水のみでもよい)、次の反応過程における強い緩衝液により、反応に適切なpHとなるようにする。過酸化水素生成及び検出過程を酵素反応で行う場合は緩衝液のpHは5~8とし、特にpH6.0~7.5が望ましい。

【0016】文献によるとアスコルビン酸は6mg/dlの割合で加えるのが望ましいとあり、3価鉄を還元後、オキシダーゼ反応を行う。アスコルビン酸はアスコルビン酸オキシダーゼを発色反応系に加えることにより、アスコルビン酸が消去されると同時に発色がおきる。この場合、微量に残存するアスコルビン酸は還元剤として2価鉄と協同効果を発揮する。

【0017】オキシダーゼ反応は、一定量の過酸化水素を生成させた後、検出過程を行う場合と、両方を同時に行う場合とがある。前者は試料中に共存する過酸化水素消費物質が多量に存在していても、正確に鉄が測定できるという画期的な利点を有する。すなわち、試料中に例えばアスコルビン酸、尿酸、ビリルビンなどの還元性物質が多量に存在していても、鉄の還元剤を加えないで一連の反応を行えば鉄は反応に関与しないためそのブランクのみが定量される。次に、鉄の還元剤を加えて一連の反応を行い、両者を差し引けば鉄の定量ができる。この方法は、血清、血しょうのようにアスコルビン酸などが共存していても酵素作用により鉄は3価として存在する試料に対して極めて有用である。

【0018】生体試料については、オキシダーゼ反応における基質が試料中に含まれている場合はその消去反応を行う必要がある。例えばグルコースオキシダーゼを用いる場合は、グルコースオキシダーゼをもって、肉因性のグルコースを消去するか、ヘキソキナーゼをもって消

6

去する。ヘキソキナーゼを用いる場合は、オキシダーゼ反応と競合するため、マグネシウムキレート剤等の阻害剤を加えて失活させる必要がある。本発明における鉄キレート剤の多くはマグネシウムキレートともなるので、キレート剤の利用は極めて優れた方法といえる。

【0019】鉄を蛋白から分離させるキレート剤はオキシダーゼ反応と共存させてもよいし、次のオキシダーゼ検出反応時に共役させてもよい。後者の場合は、鉄をあらかじめトランスフェリン、アルブミン等から分離させておいてもよい。この目的には、液のpHを2~4とする。

【0020】他の方法及び、他の酵素法で困難であった血清の鉄結合能も本発明によれば簡単に測定できる。その原理を以下に示す。まず、上述した方法に従い、鉄キレート剤を共存させて、血清鉄を定量する。次に、血清に鉄イオンを過剰量加えて、鉄キレート剤を共存させないで鉄を定量する。この場合、蛋白は鉄により飽和し、その分は反応しないので、遊離の鉄イオンのみが測定される。加えた鉄量から血清鉄及び遊離の鉄量を差し引けば鉄結合能が求められる。

【0021】本発明では強い還元剤であるアスコルビン酸等を用いた場合、銅の影響を若干うける。銅については試料中の銅と同量の硝酸銅を求めて加えるとよい。もしくは、バソクアロインなど、銅と特異的に沈澱物を生じる試薬を加える。尿酸、ビリルビンの還元性物質はそれぞれ尿酸オキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼにより消去後発色反応を行う。この場合、消去反応で生成した過酸化水素は鉄の還元剤によって消失し、発色反応に影響しない。

【0022】

【実施例】

【実施例1】

グルコースオキシダーゼとアスコルビン酸を用いる方法

(1) 鉄検量線用標準液の調製

硫酸第二鉄(和光純薬工業製)を蒸留水で希釈し、塩酸を一滴加えた後定容し1、2.5、5、10μg/mlの鉄(II)検量用標準液を調製した。ただし、別に原子吸光度法により、和光純薬工業製鉄標準液を対照として濃度を測定し補正係数を求めた。

(2) 鉄の定量

試験管に鉄検量用標準液0.10mlをとり、4-アミノアンチピリン0.1mg/ml、アスコルビン酸0.08mg/ml、及びグルコースオキシダーゼ(Aspergillus niger、和光純薬工業製)30U/mlを含む25mM酢酸緩衝液(pH5)1.0mlを加え37℃で5分間インキュベートする。次に、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン(EMSE)0.6mg/ml、グルコース0.05mg/ml、ペルオキシダーゼ(西洋わさび由来、和光純薬工業製)10U/ml、アスコ

ルビン酸オキシダーゼ(キューリ由来、和光純薬工業製)10U/mlを含む100mMグッド緩衝液(HEPES、pH6.8)2.0mlをあらかじめ37℃にインキュベートしたものを上述の溶液に加え、吸光度変化を分光光度計(日立製UV3400)で測定した。得られた検量線を図1に示す。本法では試料中にグルコースが少量含まれていてもグルコースオキシダーゼにより分解されて過酸化水素となり、これはさらにアスコルビン酸により還元されて呈色には影響しない。しかし、グルコースが相当量になるとアスコルビン酸が不足し、誤差となる。又、試料にアスコルビン酸が多量に含まれている場合も発色反応に影響する。アスコルビン酸オキシダーゼは多い程高精度な結果が得られる。

【0023】

【実施例2】

コリンオキシダーゼとアスコルビン酸を用いる方法

(1) 鉄検量線用標準液の調製

実施例1と同じようにして、125、250、375、475 μ g/dlを調製した。

(2) 鉄の定量

試験管に鉄検量線用標準液0.080mlをとり、これに4-アミノアンチピリン0.1mg/ml、塩化コリン0.4mg/ml、アスコルビン酸0.12mg/mlを含む20mM酢酸緩衝液(pH2)1.0mlを加え37℃で5分間インキュベートする。次に、EMSE 0.6mg/dl、ペルオキシダーゼ(西洋わさび由来、オリエンタル酵母製)10U/ml、コリンオキシダーゼ(アルカリゲネス由来、和光純薬工業製)6U/ml、アスコルビン酸オキシダーゼ8キューリ由来、和光純薬工業製)3U/mlを含む200mMグッド緩衝液(pH7.0、25℃)を37℃にインキュベートしたもの2mlを上述の溶液に加え、1分後及び3分後の吸光度を分光光度計(日立製UV3400)で測定し、両方の吸光度差を計算した。得られた検量線を図2に示す。本法では、pH2の溶液と試料を混合し、37℃で5分間インキュベートすることにより、コロイド状の水酸化鉄、コロイド状の酸化鉄をも分解し、定量できる。本法はエンドポイント法であるが、塩化コリンを数倍量とすることにより速度法が可能である。終点法か速度法かは塩化コリンと、コリンオキシダーゼ量に依存する。アスコルビン酸が多量に加えてあるのは、0.5分後の吸光度を空試験値とするためである。にぎりのない試料については、アスコルビン酸は少量でよい。

【0024】

【実施例3】

グリセロール-3-リン酸オキシダーゼと塩酸ヒドロキシルアミンを用いる方法

(1) 鉄検量線用標準液の調製

試薬特級硫酸第一鉄(和光純薬工業製)を蒸留水で定容し、125、250、375 μ g/dlの鉄(11)検

量線用標準液を調製した。

(2) 鉄の定量

試験管に鉄検量線用標準液0.030mlをとり、これに4-アミノアンチピリン0.3mg/ml、塩酸ヒドロキシアミン0.15mg/ml、グリセロール-3-リン酸1.5mg/mlを含む水溶液(pH2.5、25℃)1.0mlを加え37℃にインキュベートする。次に、EMSE 0.3mg/ml、ペルオキシダーゼ(西洋わさび由来、和光純薬工業製)0.4U/ml、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ(マイクロオーガニズム由来、EC1.1.3.21、ベーリンガーマンハイム製)1.5U/ml、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム5mg/mlを含む200mMグッド緩衝液(pH7.5、25℃)2.0mlをあらかじめ37℃にインキュベートしたものを、上述の溶液に加え、生じる吸光度変化(0.2から0.7分の0.5分間)を分光光度計(日立製UV3400)で測定した。検量線を図3に示す。次に血清0.030mlをとり、同様に測定した結果、測定値は95mg/dlであった。この血清をバゾフェナンスロリン吸光度法で測定した結果は92mg/mlであり、極めてよく一致した。

【0025】

【実施例4】

硫酸ヒドラジンを用いた場合

(1) 鉄検量線用標準液の調製

実施例3と同じであるが、濃度系列を2.4、6.0、12、25 μ g/mlとした。

(2) 鉄の定量

試験管に鉄検量線用標準液0.10mlをとり、これに4-アミノアンチピリン0.2mg/ml、塩化コリン0.6mg/ml、硫酸ヒドラジン飽和水(20℃)0.04ml/mlを含む水溶液(pH2.5、25℃)2.0mlを加え25℃で5分間インキュベートする。次に、EMSE 1mg/ml、ペルオキシダーゼ(西洋わさび由来、和光純薬工業製)0.5U/ml、コリンオキシダーゼ(アルカリゲネス由来、和光純薬工業製)1.1U/mlを含む200mMグッド(HEPES)緩衝液(pH7.0、25℃)を25℃にインキュベートしたもの1mlを、上述の溶液に加え、0.5分後から2.5分後の吸光度を分光光度計(日立製UV3400)で測定し、両方の吸光度差を計算した。得られた検量線を図4に示す。

【0026】

【発明の効果】本発明の効果は次のとおりである。本発明では酵素反応を利用しているので、温和な反応条件で簡便かつ短時間に鉄の測定が可能である。又、酵素反応により、適量の過酸化水素を検出と同一の溶液中で発生させることが可能であり、反応中鉄濃度としてppt (ng/ml~pg/ml)という極めて高い感度で得られる。又、試料中濃度としては図3から吸光度変化

0.001を与える数ppb (数 $\mu\text{g}/\text{dl}$) が検出可能である。本発明で用いる酵素は鉄を補酵素としないので、鉄キレート剤を共存させることが可能であり、鉄を補酵素とする方法に比較して温和、簡便な過程にて鉄を定量できる。この特徴を生かし、他の方法、他の酵素法では困難であった血清における鉄結合能をも簡単に測定できる。定電位クーロメトリーにより、2価鉄を3価鉄に酸化して鉄を定量する方法において、還元剤を共存させることにより、本発明の増幅効果により高感度定量が可能となる。本発明の原理は、銅、マンガンなど微量の

酸化還元金属の定量に応用できる。

【0027】

【図面の簡単な説明】

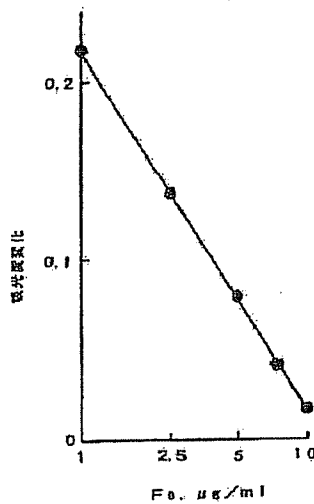
【図1】グルコースオキシダーゼを用いたときの鉄の検量線

【図2】コリンオキシダーゼを用いたときの鉄の検量線

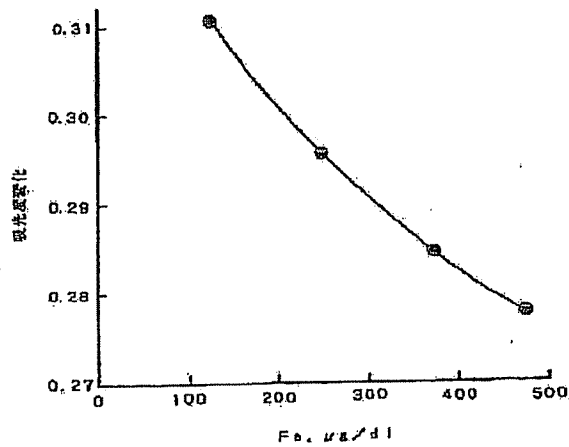
【図3】グリセロール-3-リン酸オキシダーゼを用いたときの鉄の検量線

【図4】硫酸ヒドラジンを用いたときの鉄の検量線

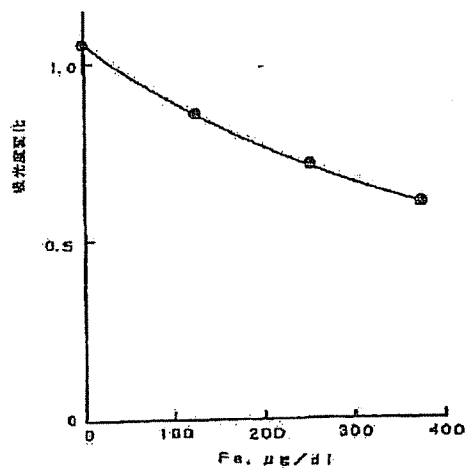
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

